

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

01.09.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 9月18日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-272043
[ST. 10/C]: [JP2002-272043]

REC'D 17 OCT 2003

WIPO PCT

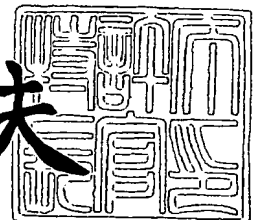
出 願 人
Applicant(s): 科学技術振興事業団

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02376-YS

【提出日】 平成14年 9月18日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/68

【発明の名称】 オルガネラ局在タンパク質の解析方法と解析材料

【請求項の数】 14

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都新宿区市ヶ谷薬王寺町 4 5 - 1 - 2 0 3

 【氏名】 梅澤 喜夫

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県松戸市稔台 6 1 7 - 1 8

 【氏名】 小澤 岳昌

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

 【識別番号】 100093230

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 西澤 利夫

 【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 009911

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 0013341

【プルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 オルガネラ局在タンパク質の解析方法と解析材料

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試験タンパク質がオルガネラに局在するか否かを解析する方法であって、以下のステップ:

(a) インテインの一方のハーフペプチド、蛍光タンパク質の一方のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド(a)を真核細胞内に導入するステップ;

(b) 前記蛍光タンパク質の他方のハーフペプチドおよび前記インテインの他方のハーフペプチドを含む融合ペプチド(b)に結合した試験タンパク質を真核細胞内に導入するステップ; および

(c) 前記蛍光タンパク質の発する蛍光信号を検出するステップ、を含むことを特徴とするオルガネラ局在タンパク質の解析方法。

【請求項 2】 ステップ(a)において、信号特性の異なる蛍光タンパク質のそれぞれ一方のハーフペプチドと異なるオルガネラ標的シグナルペプチドを含む 2 種以上の融合ペプチド(a)を真核細胞内に導入し、ステップ(b)において、前記蛍光タンパク質のそれぞれ他方のハーフペプチドを含む 2 種以上の融合ペプチド(b)のそれぞれに結合した試験タンパク質を真核細胞内に導入し、ステップ(c)において蛍光信号の特性を検出する請求項 1 の解析方法。

【請求項 3】 ステップ(a)において、融合ペプチド(a)を発現する組換えベクター(A)を真核細胞にトランスフェクションすることによって融合ペプチド(a)を真核細胞内に導入する請求項 1 または 2 の解析方法。

【請求項 4】 ステップ(b)において、融合ペプチド(b)と試験タンパク質とを一体として発現する組換えベクター(B)を真核細胞にトランスフェクションすることによって試験タンパク質および融合ペプチド(b)を真核細胞に導入する請求項 1 または 2 の解析方法。

【請求項 5】 インテインのハーフペプチド、蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド(a)。

【請求項 6】 蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびインテインのハーフ

ペプチドを含む融合ペプチド(b)。

【請求項 7】 インテインのハーフペプチド、蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド(a)を発現する組換えベクター(A)。

【請求項 8】 蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびインテインのハーフペプチドを含む融合ペプチド(b)と、任意の試験タンパク質とを一体として発現する組換えベクター(B)。

【請求項 9】 請求項 5 の融合ペプチド(a)または請求項 7 の組換えベクター(A)と、請求項 6 の融合ペプチド(b)または請求項 8 の組換えベクター(B)とを含むことを特徴とするオルガネラ局在タンパク質の解析用プローブセット。

【請求項 10】 融合ペプチド(a)または組換えベクター(A)が発現する融合ペプチド(a)が、信号特性の異なる蛍光タンパク質のそれぞれ一方のハーフペプチドと異なるオルガネラ標的シグナルペプチドを含む 2 種以上であり、融合ペプチド(b)が、前記蛍光タンパク質の他方のハーフペプチドを含む 2 種以上である請求項 9 のプローブセット。

【請求項 11】 インテインのハーフペプチド、蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド(a)を保有する真核細胞。

【請求項 12】 請求項 11 の真核細胞を 2 以上有する細胞キット。

【請求項 13】 信号特性の異なる蛍光タンパク質のそれぞれ一方のハーフペプチドと異なるオルガネラ標的シグナルペプチドを含む 2 種以上の融合ペプチド(a)を保有する真核細胞。

【請求項 14】 請求項 13 の真核細胞を 2 以上有する細胞キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、オルガネラ局在タンパク質の解析方法と解析用材料に関するものである。さらに詳しくは、真核細胞の各種オルガネラに局在するタンパク質を簡便かつ正確に解析する方法と、この方法に用いる材料に関するものである

【0002】

【従来の技術】

真核細胞、特に哺乳類細胞における最もはっきりした特徴の一つは、各タンパク質が個々のオルガネラ（細胞小器官）に局在しているということである。このタンパク質局在化はタンパク質の機能に密接な関連があり、そのため、あるタンパク質の優先的な局在化が機能を決定するための重要な指標となる場合も多い。従って、タンパク質の細胞内局在を解析することによって、そのタンパク質の機能が特定され、さらには新しい生物学的意義が形成される可能性がある。

【0003】

オルガネラ局在化タンパク質を解析するための従来技術としては以下が知られている。

- (i) 細胞分画技術と二次元電気泳動／質量分析法からなる方法（非特許文献1）。この方法は、細胞を個々の器官ごとに分画し、それぞれで発現しているタンパク質を二次元電気泳動して比較し、器官特異的なタンパク質の質量分析結果からそのタンパク質を同定する方法であり、タンパク質の系統的な解析に役立つ。しかしながら、この従来技術(i)は細胞内オルガネラの個々の収率と濃度に完全に依存しており、さらに重要な点としては、分画精製の難しいオルガネラには用いることができない。
- (ii) 発現クローニング（非特許文献2、3）。この方法は、細胞核内で発現が活性化するレポーター分子を組み込んだ細胞内に転写因子を連結した試験タンパク質を導入し、レポーター分子の信号を検出する方法である。試験タンパク質に機能的な核局在シグナルが含まれている場合には試験タンパク質および転写因子が細胞核内に移行し、レポーター分子の信号を検出することができる。しかしながら、この従来技術(ii)はレポーター分子の発現が核内転写因子に依存しているため、核以外の器官には適用できない。
- (iii) 視覚的スクリーニング（非特許文献4-6）。この方法は、信号を発する蛍光タンパク質と試験タンパク質との融合タンパク質を高等真核細胞内で発現させ、蛍光タンパク質の蛍光信号を顕微鏡により観察することによって試験タン

パク質の細胞内局在を調べる方法である。この従来技術(iii)は様々なオルガネラ局在化タンパク質を同定するための強力なツールであるが、蛍光顕微鏡下で蛍光タンパク質の細胞内局在を分析および同定するためには多大な労力と時間を必要とする。

【0004】

一方、この出願の発明者等は、タンパク質スプライシングの原理（非特許文献7、8）を用いて2種類のタンパク質の相互作用（タンパク質-タンパク質相互作用）を解析する方法とそのためのプローブを発明し、すでに特許出願している（特許文献1）。

【0005】

【特許文献1】

国際公開W002/08766号パンフレット

【非特許文献1】

Lopez, M. F. and Melov, S., Circ. Res. 2002, 90, 380-389

【非特許文献2】

Ueki, N. et al., Nature Biotechnol. 1998, 16, 1338-1342

【非特許文献3】

Rhee, Y. et al., Nature Biotechnol. 2002, 18, 433-437

【非特許文献4】

Bejarano, L. A. and Gonzacz, C. J., Cell Sci. 1999, 112, 4207-4211

【非特許文献5】

Misawa, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 92, 9146-9150

【非特許文献6】

Simpson, J. C. et al., EMBO Report 2000, 3, 287-292

【非特許文献7】

Gimble, F. S., Sci. Biol. 1998, 5, R251-256

【非特許文献8】

Ozawa, T. et al., Anal. Chem. 2001, 73, 5866-5874

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

前記のとおり、オルガネラ局在化タンパク質の解析のための従来技術(i)～(ii)は、解析対象となるオルガネラの種類が限定されることや、その解析に多大な労力や時間を必要とするなどの問題点を有している。このため、特に大規模なタンパク質ライブラリーやcDNAライブラリーを対象とする広範囲はスクリーニング(ハイスループットスクリーニング)には全く適さない方法であった。

【0007】

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、あらゆるオルガネラを対象として、簡便かつ正確にタンパク質局在を解析することのできる新しい方法と、この方法に使用する解析用材料を提供することを課題としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するものとして、以下の(1)～(14)の発明を提供する。

(1) 試験タンパク質がオルガネラに局在するか否かを解析する方法であって、以下のステップ:

(a) インテインの一方のハーフペプチド、蛍光タンパク質の一方のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド(a)を真核細胞内に導入するステップ;

(b) 前記蛍光タンパク質の他方のハーフペプチドおよび前記インテインの他方のハーフペプチドを含む融合ペプチド(b)に結合した試験タンパク質を真核細胞内に導入するステップ; および

(c) 前記蛍光タンパク質の発する蛍光信号を検出するステップ、を含むことを特徴とするオルガネラ局在タンパク質の解析方法。

(2) ステップ(a)において、信号特性の異なる蛍光タンパク質のそれぞれ一方のハーフペプチドと、異なるオルガネラ標的シグナルペプチドとを含む2種以上の

融合ペプチド(a)を真核細胞内に導入し、ステップ(b)において、前記蛍光タンパク質のそれぞれ他方のハーフペプチドを含む2種以上の融合ペプチド(b)のそれぞれに結合した試験タンパク質を真核細胞内に導入し、ステップ(c)において蛍光信号の特性を検出する前記発明(1)の解析方法。

(3) ステップ(a)において、融合ペプチド(a)を発現する組換えベクター(A)を真核細胞にトランスフェクションすることによって融合ペプチド(a)を真核細胞内に導入する前記発明(1)または(2)の解析方法。

(4) ステップ(b)において、融合ペプチド(b)と試験タンパク質とを一体として発現する組換えベクター(B)を真核細胞にトランスフェクションすることによって試験タンパク質および融合ペプチド(b)を真核細胞に導入する前記発明(1)または(2)の解析方法。

(5) インテインのハーフペプチド、蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド(a)。

(6) 蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびインテインのハーフペプチドを含む融合ペプチド(b)。

(7) インテインのハーフペプチド、蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド(a)を発現する組換えベクター(A)。

(8) 蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびインテインのハーフペプチドを含む融合ペプチド(b)と、任意の試験タンパク質とを一体として発現する組換えベクター(B)。

(9) 前記発明(5)の融合ペプチド(a)または前記発明(7)の組換えベクター(A)と、前記発明(6)の融合ペプチド(b)または前記発明(8)の組換えベクター(B)とを含むことを特徴とするオルガネラ局在タンパク質の解析用プローブセット。

(10) 融合ペプチド(a)または組換えベクター(A)が発現する融合タンパク質(a)が、信号特性の異なる蛍光タンパク質のそれぞれ一方のハーフペプチドと、異なるオルガネラ標的シグナルペプチドとを含む2種以上であり、融合ペプチド(b)が、前記蛍光タンパク質のそれぞれ他方のハーフペプチドを含む2種以上である前記発明(9)のプローブセット。

- (11) インテインのハーフペプチド、蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド(a)を保有する真核細胞。
- (12) 前記発明(11)の真核細胞を2以上有する細胞キット。
- (13) 信号特性の異なる蛍光タンパク質のそれぞれ一方のハーフペプチドと、異なるオルガネラ標的シグナルペプチドとを含む2種以上の融合ペプチド(a)を保有する真核細胞。
- (14) 前記発明(13)の真核細胞を2以上有する細胞キット。

【0009】

すなわち、前記発明(1)～(4)の解析方法は、インテイン (intein) のタンパク質スプライシング (非特許文献7、8) による蛍光タンパク質の再構築を基礎としており、前記発明(5)～(14)の各種材料を用いて実施することができる。

【0010】

なお、この出願の発明において、「タンパク質」および「ペプチド」とは、細胞から単離精製されたもの、遺伝子工学的に製造されたもの、合成されたもの、またはそれらと構造的に類似の生物活性等価物であって、ペプチド結合として知られるアミド型の連結により連なっているアミノ酸のポリマーを意味するのに使用する。

【0011】

「試験タンパク質」は、生物細胞 (特に真核細胞) において発現する機能既知または機能未知のタンパク質であり、特にオルガネラの局在が不明のタンパク質である。アミノ酸配列構造が既知であるものが好ましく、そのアミノ酸配列をコードする塩基配列が既知であるものがさらに好ましい。この試験タンパク質は、例えば公知のタンパク質ライブラリーから選択して用いることができ、あるいはcDNAライブラリー (既存ライブラリー、または任意細胞のトータルRNAから調製したcDNAライブラリー) の各cDNAクローンから遺伝子工学的に作製したタンパク質を用いることができる。

【0012】

「真核細胞」は、酵母細胞、昆虫細胞、動物細胞等であり、特にヒトを含めた哺乳動物細胞である。

【0013】

「オルガネラ」は、真核細胞膜の内部に存在し、細胞の各種機能を分業している構造単位であって、例えば細胞核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、分泌顆粒、分泌小胞、リソソーム、ファゴソーム、エンドソーム、ペルオキシソームなどを包含する。

【0014】

「オルガネラ標的シグナルペプチド」とは、各オルガネラに特異的に局在化するタンパク質の全長、またはそれら局在化タンパク質に存在してそれぞれの局在化のために働く移行シグナル（または局在化シグナル）ペプチドであり、公知のものを使用することができる。例えば、核標的シグナルペプチドとしては核内タンパク質（例えばヒストンやウイルス性タンパク質等）またはその部分シグナルペプチドを適宜に使用することができる。また、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、ペルオキシソーム等のオルガネラの場合には、細胞分画法等において各オルガネラの標識酵素として使用される酵素（例えば、ミトコンドリアではシトクロムcオキシダーゼ、小胞体ではグルコース-6-ホスファターゼ、ゴルジ体ではガラクトシルトランスフェラーゼ、ペルオキシソームではカタラーゼなど）またはそのシグナルペプチドを使用することができる。これらのオルガネラ標的ペプチドは、公知のタンパク質データベース（例えば、URL: HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez" http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez）等からアミノ酸配列やそれをコードするポリヌクレオチドの塩基配列情報を得ることができる。

【0015】

「インテイン」は、翻訳後のタンパク質からスプライシングによって切り出される内部タンパク質セグメントであり、各種生物由来の野性型インテインおよびタンパク質スプライシングに関与する「機能的部分」であってもよい。インテインとしては、具体的には、例えば酵母*Saccharomyces cerevisiae*、カンジダ菌*Candida tropicalis*または古細菌*Thermoplasma acidophilum*等に由来のVMA、結核菌*Mycobacterium tuberculosis*由来のrecAおよびppsl、藍藻類*Synechocystis*由来のDnaBおよびDnaE等を使用することができるが、これらに限定されるものでは

ない。使用可能なインテインの種類やアミノ酸配列および塩基配列はInBase: the Intein Database (Nucleic Acids Res. 2002, 30(1), 383-384; URL: HYPERLINK "http://www.neb.com/neb/inteins.html" http://www.neb.com/neb/inteins.html) から詳しく知ることが出来る。

【0016】

「蛍光タンパク質」とは、励起光を照射すると蛍光を発するタンパク質またはその機能的部分であり、例えば、発光クラゲ由来の緑色蛍光タンパク質(GFP)や、その変異体であるEGFP、EYFP (黄色蛍光)、ECFP (青色蛍光)、DsRed1やDsRed2 (赤色蛍光)、ウミシイタケ由来の緑色蛍光タンパク質hrGFPなどが例示できる。これらの蛍光タンパク質のアミノ酸配列やそれをコードする塩基配列についても、公知のタンパク質データベース (例えば、URL: HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez" http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) 等から情報を得ることができる。

【0017】

「ハーフペプチド」とは、前記のインテインおよび蛍光タンパク質のそれぞれのC端側およびN端側アミノ酸配列を有するペプチドであり、C端側ハーフペプチドとN端側ハーフペプチドが一体化するとインテインおよび蛍光タンパク質の全長タンパク質または全長タンパク質の機能性部分となる。一方のハーフペプチドがC端側の場合には、他方のハーフペプチドはN端側であり、一方がN端側の場合、他方はC端側である。また「ハーフ」は必ずしも半分を意味する訳でなく、ある特定のアミド結合を切断することにより、タンパク質の機能的部分を二分することを意味する。

【0018】

「融合ペプチド」とは、前記の各ハーフペプチドや標的シグナルペプチドが縦列一体化したペプチドであり、各ペプチドのC端とN端がペプチド結合によって連結されたものである。また各ペプチドが「リンカーペプチド」によって連結されたものであってもよい。例えば、前記のインテインVDEでは、エンドヌクレアーゼドメインを削除し、屈曲性のドデカペプチドリンカーで置き換えた変異体が高いスプライシング活性を示すことが知られている (Cooper, A. A., Chen, Y. J.

, Lindorfer, M.A., and Stevens, T. H., EMBO J., 12, 2575-2583, 1993; Cho ng, S. and Xu, M.-Q., J. Biol. Chem., 272, 15587-15590, 1997)。

【0019】

この発明において使用するその他の用語や概念については、発明の実施形態や実施例の記載において説明する。また、この発明を実施するために使用する様々な遺伝子操作技術等は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献（例えば、Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989）等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能なものである。

【0020】

以下、前記の各発明の実施形態を詳しく説明する。

【0021】

【発明の実施の形態】

発明(1)は、以下のステップを行うことによって、試験タンパク質が任意のオルガネラに局在するか否かを解析する方法である。

ステップ(a): インテインの一方のハーフペプチド、蛍光タンパク質の一方のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド(a)を真核細胞内に導入する。

ステップ(b): 前記蛍光タンパク質の他方のハーフペプチドおよび前記インテインの他方のハーフペプチドを含む融合ペプチド(b)に結合した試験タンパク質を真核細胞内に導入する。

ステップ(c): 前記蛍光タンパク質の発する蛍光信号を検出する。

【0022】

この発明(1)の方法は、この発明によって提供される融合ペプチド(a)（発明(5)）と融合ペプチド(b)（発明(6)）を用いて実施することができる。それぞれの融合ペプチドに使用するインテインのハーフペプチドおよび蛍光タンパク質のハーフペプチドは、同一のインテインおよび蛍光タンパク質からそれぞれ調製する。また、それぞれのハーフペプチドはC端側同士、N端側同士を連結する。融合ペプチド(a)がC端側ハーフペプチド同士の組み合わせの場合には、融合ペプチド(b)

)はN端側ハーフペプチド同士とし、その逆であってもよい。ただし、インテインのN端側ハーフペプチドとC端側ハーフペプチドがオルガネラ内で連結してスプライシング活性を持つように、蛍光タンパク質のN端側ハーフペプチド (FPn) およびインテインのN端側ハーフペプチド (INTn) の組み合わせ (N-FPn/INTn-C)、インテインのC端側ハーフペプチド (INTc) および蛍光タンパク質のC端側ハーフペプチド (FPc) の組み合わせ (N-INTc/FPc-C) とする。以下では、融合ペプチド(a)がN-INTc/FPc-Cであり、融合ペプチド(b)がN-FPn/INTn-Cである場合を例として説明する。

【0023】

融合ペプチド(a)におけるオルガネラ標的シグナルペプチド (OTS) は、N-INTc/FPc-CのC端側に連結してもよく (N-OTS/INTc/FPc-C)、N端側に連結してもよい (N-INTc/FPc/OTS-C)。また、融合ペプチド(b)に連結する試験タンパク質 (testP) も、そのいずれの側に位置してもよい (N-testP/FPn/INTn-CまたはN-FPn/INTn/testP-C)。

【0024】

融合ペプチド(a)、および融合ペプチド(b)/testPは、それぞれのペプチド/タンパク質を公知の方法によってペプチド結合させて作製することができる。また、公知の固相合成法等によって化学合成して作製することもできる。あるいは、それぞれのペプチドをコードするポリヌクレオチドを連結して融合ポリヌクレオチドを作製し、in vitro転写翻訳系や適当な宿主-ベクター系で発現させることによっても作製することができる。

【0025】

例えば融合ペプチドをin vitro転写翻訳で作製する場合には、前記の融合ポリヌクレオチドを、RNAポリメラーゼプロモーターを有するベクターに挿入して発現ベクターを作製し、このベクターを、プロモーターに対応するRNAポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加する。RNAポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6などが例示できる。これらのRNAポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript IIなどが例示できる。

【0026】

融合ペプチドを、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNAクロニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに前記のDNA断片を組換えた発現ベクターを作成し、培養物から融合ペプチドを単離する。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescript II、pET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。

【0027】

また融合ペプチドを真核細胞で発現させる場合には、前記の融合ポリヌクレオチドを、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作成し、真核細胞内に導入すれば、融合ペプチドを形質転換真核細胞で発現させることができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pcDNA3、pMSG、pYES2などが例示できる。真核細胞としては、サル腎臓細胞COS7、チャイニーズハムスター卵巢細胞CHOなどの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、目的とする融合ペプチドを発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。発現ベクターを真核細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リボソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法を用いることができる。

【0028】

融合ペプチドを原核細胞や真核細胞で発現させたのち、培養物から目的ペプチドを単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせることができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0029】

ステップ(a)および(b)において、融合ペプチド(a)および融合ペプチド(b)/testPを細胞内に導入するには、例えば、脂質 (BioPORTER (Gene Therapy Systems

社、米国)、Chariot (Active Motif社、米国)等)を用いた細胞内導入法を採用することができる。また、細胞膜通過ペプチドであるHIV-1・TATのPTD (prote in transduction domain) や、ショウジョウバエのホメオボックスタンパク質アンテナペディアのPTDを前記の融合ペプチドに連結させることによって、融合ペプチドを細胞内に導入することもできる。

【0030】

あるいはまた、この発明によって提供される組換えベクター(A) (発明(7)) および組換えベクター(B) (発明(8)) を用いる方法 (発明(3)、(4)) によっても目的の融合ペプチドを細胞内に導入することができる。この発明(7)および(8)の方法は、融合ペプチドの細胞内導入をより簡便かつ確実に行うことができるという点において好ましい方法である。組換えベクター(A)および(B)は、融合ペプチドの遺伝子工学的作製について説明した真核細胞発現用ベクターと融合ポリヌクレオチドを用いて作製することができる。これらの組換えベクターを真核細胞内に前記の公知方法によって導入すれば、融合ポリヌクレオチドがコードする融合ペプチドを細胞内で発現させることができる。

【0031】

ステップ(a)において、以上の方法により細胞内に導入された融合ペプチド(a)は、そのOTSによって指定のオルガネラ内に移行する (図1)。また、ステップ(b)において細胞内に導入された融合ペプチド(b)/test Pは、そのtest Pが指定のオルガネラ局在性を有している場合には、そのオルガネラ内に移行し、そこに存在する融合ペプチド(a)と相互作用し、会合したINTnとINTcがタンパク質スプライシングによって切り出され、FPnとFPcが再構築されて蛍光信号を発する (図1)。

【0032】

従って、ステップ(c)において細胞の蛍光信号を検出することによって、test Pが指定のオルガネラ局在性を有しているか否かを判定することができる。蛍光信号の検出は、細胞を蛍光顕微鏡で観察することによって行うことができる。あるいは、蛍光活性化セルソーティング (fluorescence-activated cell sorting : FACS) 法によって蛍光信号を発する細胞を選択するようにしてもよい。このFA

CSを用いる方法は、その簡便性によって、例えば大規模なタンパク質ライブラリーやcDNAライブラリーを対象とする広範囲なスクリーニング（ハイスループットスクリーニング）を可能とするために、好ましい方法である。

【0033】

この出願の発明(2)は、前記発明(1)の別形態の解析方法である。すなわち、この発明(2)の方法では、ステップ(a)において、一つの細胞の異なる2以上のオルガネラにそれぞれ融合ペプチド(a)を導入する。それぞれの融合ペプチド(a)は、オルガネラ標的シグナルペプチドがそれぞれ異なるオルガネラを標的とするペプチドであり、蛍光タンパク質がそれぞれ異なる特性（色調等）を有している。例えば、ミトコンドリアには緑色蛍光タンパク質（EGFP）、小胞体には黄色蛍光タンパク質（EYFP）、ゴルジ体には青色蛍光タンパク質（ECFP）のそれぞれのハーフペプチドを有する融合ペプチド(a)を存在させる。そして、ステップ(b)において、前記各蛍光タンパク質の他方のハーフペプチドを有する融合ペプチド(b)に試験タンパク質を結合させて細胞内に導入し、細胞が発する蛍光信号の色調（緑、黄、青）または色調変化に対応する吸光度を検出すれば、試験タンパク質がミトコンドリア、小胞体およびゴルジ体のいずれに局在性を有するかを判定することができる。

【0034】

なお、この発明(1)および(2)は、この出願によって提供されるプローブセット（発明(9)、(10)）を用いることによって効率よく実施することができる。さらには、この出願によって提供される細胞（発明(11)および(13)）を用いることによって、それぞれのステップ(a)を省略することができる。また、これらの細胞は、それぞれ2以上の細胞集団からなる細胞キット（発明(12)および(14)）とすることもできる。この発明(12)の細胞キットは、全ての細胞が同一オルガネラに融合ペプチド(a)を備えている複数個の細胞集団であってもよく、あるいはそれぞれに異なるオルガネラに融合ペプチド(a)を備えている複数個の細胞集団であってもよい。また、発明(14)の細胞キットでは、全ての細胞が2種以上の同一オルガネラにそれぞれ融合ペプチド(a)を備えている複数個の細胞集団であってもよく、あるいはそれぞれに2種以上の異なるオルガネラに融合ペプチド(a)を備

えている複数個の細胞集団であってもよい。なお、この細胞キットでは、細胞が浮遊細胞の場合には適当な液体培地中に各細胞を浮遊させた状態とすることができ、接着性の細胞の場合には、いわゆる「細胞チップ」の形態とすることもできる。さらには、これらの細胞キットを構成する細胞は同一種の細胞であってもよく、あるいは異なる細胞であってもよい。例えば、正常細胞と疾患細胞（例えば癌細胞など）とを組み合わせる細胞キットを構成することもできる。

【0035】

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0036】

【実施例】

1. 方法

1.1. 発現ベクターの作成

アミノ酸1-157を強化したEGFP cDNAをポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により増幅し、Lys-Phe-Ala-Glu-Tyr-Cys（配列番号1）をspEGFPのC端に導入した。このcDNAをDnaEインテインのN端スプライシングドメインのcDNAに融合させ、原核ベクターBluescript中でサブクローニングした。PCR産物をシーケンス解析して塩基配列を確認し、pMXベクター内のSalI制限部位にサブクローニングした。ミトコンドリア標的シグナルペプチド（MTS）またはカルモジュリンと結合したEGFPN端側ハーフペプチド（EGFPn）とDnaEのN端側ハーフペプチド（DnaEn）からなる融合ペプチド(b)を作成するため、PCRによりcDNAを増幅し、BamHI（5'）およびNotI（3'）制限部位に導入した。このPCR産物をpMX-Mito/LIB中のフレーム内に挿入し、これらのシーケンスを検証した（図2参照）。

1.2. 安定クローンの選別

MTSを結合したDnaEのC端側ハーフペプチド（DnaEc）のcDNAをPCRにより増幅した。EGFPの158-238に対応するカルボキシル末端の半分のcDNAを、Cys-Phe-Asn-Lys-Ser-His（配列番号2）のペプチドをアミノ末端に伸張しつつ、PCRにより増幅した。これら2つのPCR産物をMunI部位で結合させて融合ペプチド(a)を作製し、pBluescript中でサブクローニングを行った（図2参照）。この産物をシーケ

ンス解析して塩基配列を確認し、pMXベクター内のBamHI (5') およびSalI (3') 制限部位に導入した。DH5 α' 大腸菌中で増幅した後、融合遺伝子をLipofectamine Plus (Invitrogen) を用いてPlatE細胞内にトランスフェクションした。2日培養後、高力価のレトロウイルスを収集し、BNL1ME細胞内にトランスフェクションした。成長因子を含むG418 (Invitrogen社) 中での約10日間にわたる選択培養後に、安定した発現細胞を取得した (図3 参照)。

1.3. cDNAライブラリーの構築

1×10^8 BNL1ME細胞からのPoly(A)+RNAの精製は、FastTrackキット (Invitrogen社) を用いて行った。ランダムヘキサマーを用いたpoly(A)+ RNAからのcDNAの合成は、cDNA合成キット (Invitrogen社) を用いて行った。結果的に得られたcDNAに対して、カラムクロマトグラフィーとアガロースゲル電気泳動によりサイズ分画を行い、Qiaex IIキット (Qiagen社) を用いて600kbp以上の長さのcDNAフラグメントをアガロースゲルから抽出した。pMX-Mito/LiBのBstXI部位へのcDNA断片の挿入は、BstXIアダプター (Invitrogen社) を用いて行った。結合DNAをエタノール沈殿し、その後DH10B-コンピテント細胞 (Invitrogen社) 中にトランスフェクションした。プラスミドDNAの精製はQiaex (Qiagen社) を用いて、16時間にわたる200mLの培養後に行った。パッケージ細胞株であるPlatEへのプラスミドのトランスフェクションは、Lipofectamine Plus (Invitrogen社) を用いて行った。2日間の培養後、高力価のレトロウイルスが収集された (図3 参照)。

1.4. ソーティング戦略

サブコンフルエント (70%) なBNL1ME細胞レイヤーを、構築したレトロウイルスライブラリーに、感染効率が20%以下となるように感染させた。感染効率の評価はpMX-EGFPを用いた対象実験により行った。細胞は感染の48時間後に分離し、直径6cmのシャーレ4枚に展開した。72時間のインキュベーション後、トリプシン-EDTAを用いて細胞をはがし、PBS緩衝液 (Gibco BRL) 中に溶解した。FACS分析の実施はALTRAフローサイトメーター (Beckmann Coulter社) 上で行い、これによりGFP-陽性単一細胞をソーティングした。これらの細胞は96ウェルのプレートでインキュベートするか、直径10cmのシャーレに蒔き、その後チップを用いてサブクロニングを行った (図3 参照)。

1.5. 組み込みcDNAの同定

BNL1MEクローンから抽出したゲノムcDNAをネステッドPCR法により増幅し、組み込まれたcDNAを回収した。プライマーは、5'-AGGACCTTACACAGTCCTGCTGACC-3' (配列番号3) および5'-GCCCTCGCCGGACACGCTGAACTTG-3' (配列番号4) のセットと、5'-CCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGC-3' (配列番号5) および5'-CGCCGTCCAGCTCGACCAGGAT-3' (配列番号6) のセットを用いた。PCRはLA Taqポリメラーゼ (Takara Shuzo社) を用いて30サイクル行った (98℃30秒で変性、58℃30秒でアニリング、72℃2分で伸張)。結果として得られた二次PCRフラグメントのシーケンス解析を、BigDyeTerminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社) を用いて行い、分析を自動シーケンサ (310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems社) により行った (図3参照)。

1.6. 遺伝子配列および遺伝子の機能的解析

それぞれのcDNAシーケンス比較は、GenBank、PDB、SwissProt、PIR、PRFを含むデータベース中のcDNAシーケンスにより、BLASTnを用いて行った。cDNA鎖の方向の同定はRIKENクローンセットにより行ったが、これらはいくつかの段階に分類されており、それらの機能は解析されている。相同性分析の実施はBlastプログラムを用いて行った。

1.7. 蛍光信号の画像化

BNL1MEクローンをガラス製シャーレ上に蒔き、生育培地の存在下で24時間にわたりインキュベーションを行った。培地を5% FCS添加PBS溶液に置換し、共焦点レーザースキャニング顕微鏡 (Carl Zeiss社) を使用して生細胞の直接映像撮影を行った。映像撮影後にミトコンドリアの染色をテトラメチルローダミンエチルエステル (TMRE; Molecular Probes社) を用いて行った。PBS緩衝液中のTMREの最終濃度は1 μ Mに調節した。インキュベーション時間は10分であった。細胞は543nmの波長で照射し、560nm LPフィルターを用いて映像を撮影した。

2. 結果

2.1. ミトコンドリアタンパク質の選択的および高感度検出

このライブラリースクリーニングを正確に行うためには、以下の2点の要件を満たす必要がある。1) ミトコンドリア内で再構成されるEGFPの蛍光強度が、FAC

S分析による検出を受けるに足りるだけ高感度かつ強力であること。2) MTS存在下でタンパク質を含む細胞を、MTSの存在しない細胞から選択的に分離して収集することが可能であること。この選択性および高感度検出を検査するため、細胞内局在について十分に特徴が分かっているタンパク質の試験を、マウス肝細胞 (BNL1ME) 内部で行った。EGFPおよびDnaEcのC端側ハーフペプチドに対応するcDNAと、チトクロームCオキシダーゼVIIIサブユニットの前駆物質に対応するミトコンドリアの標的シグナルをコードするpMX-MTS/DEc(Neo)プラスミドを構築した (図4)。スプライシング部分ではさらに5個のアミノ酸をコードするcDNAをインサートし、効率的なスプライシングが生じるようにした (図2) (Evans, J. et al., J. Biol. Chem. 2000, 275, 9091-9094)。このプラスミドをレトロウイルスに変換し、これらをBNL1ME細胞に感染させ、それぞれの試験タンパク質をミトコンドリア内で発現する安定細胞株が開発された (BNL1MEmito)。試験タンパク質として、既知の細胞質タンパク質であるカルモジュリン、またはシグナルペプチドであるMTSを用いた。これらのcDNAはEGFPnおよびDnaEnをコードするcDNAと連結し、それらの融合ペプチドをBNL1MEmito細胞内で発現させた (図4)。細胞のウエスタンブロットにより、タンパク質スプライシングが生じて未変化EGFPが産生されたことが確認されたが、この産生物は野生型EGFPよりわずかに分子量が多く、スプライシング部分における10個のアミノ酸の添加を反映している (図5)。タンパク質スプライシングがミトコンドリア内で生じていることを確認するため、BNL1MEmito生細胞の蛍光イメージを調べた。EGFPの局在は、細胞透過性のあるミトコンドリア選択的色素であるテトラメチルローダミンのエチルエステルにより染色したミトコンドリアの場合と、実質的に同じであることが確認された (図6)。しかも、タンパク質スプライシング後のEGFP形成が、N端側にMTSを連結した融合ペプチドに特異的に生じていることも確認された。

【0037】

再構築されたEGFPの蛍光強度がセルソーターによる蛍光細胞の単離に足りるほど強力であることを確認するため、ここではさまざまな感染多重度 (MOI、細胞あたりのcDNA数により定義される) で、MTS-EGFPn-DnaEnを産生するレトロウイルスをBNL1MEmito細胞に感染させた。MOIの調節は特に重要であるが、これはBNL

lMEmito細胞中でcDNAの多重集積が生じた結果、セルソーティング後に擬陽性のcDNAが単離される可能性があるためである。このため、感染効率を1細胞1遺伝子として調節することが必要であった。そのため、様々なMOIを用いた感染の48時間後に、再構成されたEGFPを含む細胞数の評価をフローサイトメトリーにより行った。MOIが5の場合には、全ての細胞が強い蛍光を示した(図7)。MOIが0.01の場合には $1.6 \pm 0.1\%$ 、MOIが0.02の場合には、 $3.6 \pm 0.3\%$ 、MOIが0.06の場合には $9.4 \pm 0.6\%$ 、MOIが0.1の場合には、 $15.4 \pm 1.1\%$ 、MOIが0.2の場合には、 $36.7 \pm 1.4\%$ 、MOIが0.5の場合には、 $60.5 \pm 1.3\%$ 、そしてMOIが1.0の場合には、 $71.1 \pm 1.0\%$ の細胞が蛍光を示した。0から0.2のMOI範囲では、蛍光細胞はMOIの増加に比例して増加しており、0から0.2のMOI範囲では感染は細胞あたり1個のcDNAとして生じていることが示された。この単回ヒット感染でのEGFPの蛍光強度は、MTSが存在または非存在である細胞を十分に分離するものであり、これは蛍光強度の2個のピーク幅が証拠となっている。これらのデータから、単一のBNLlMEmito細胞中で再構築されたEGFP量は、ミトコンドリアタンパク質の高感度検出とセルソーターを用いた選択的単離を可能とするに十分であることが確認された。

2.2. cDNAライブラリーからのミトコンドリアタンパク質の選別

ミトコンドリアタンパク質をコードする遺伝子が、大規模cDNAライブラリーから選択的に単離可能であるかどうかを検討した。BNLlMEmito細胞に由来する各cDNAを、EGFPnおよびDnaEnのcDNAフラグメントの上流にある2箇所のBstXI部位にクローニングして、cDNA-EGFPn-DnaEn融合ライブラリーを作成した(図3)。縦列融合フラグメントであるcDNA-EGFPn-DnaEnの順序はその細胞内局在を分析するために重要であるが、これはほとんどのMTSがミトコンドリアタンパク質のアミノ末端に結合するためである(Roise, D. et al., EMBO J. 1988, 7, 649-653; Von Heijne, G. EMBO J. 1986, 5, 1335-1342, 10)。このように構築されたcDNAライブラリーには 1.1×10^6 個の独立したクローンが含まれており、cDNAのサイズは平均して1.4kbpである。このライブラリーを高力価レトロウイルスパッケージ化細胞株であるPlat-E細胞(Morita, S. et al. Gene Therapy 2000, 7, 1063-1066)を用いて、レトロウイルスに変換した。予備試験では、 1×10^7 個の細胞に50 μ Lのレトロウイルス上清を感染させて、20%の感染効率を達成した。感染処理

の3日後、 1×10^5 個の細胞の蛍光強度をFACS分析によって測定した。感染細胞の母集団は、再構築EGFPの存在あるいは非存在下にある、細胞の混合物により構成されている（図8）。L領域の蛍光細胞の比率は、全細胞数の $0.089 \pm 0.008\%$ ($n=10$) であることが判明した。

【0038】

次に、FACS分析によってL領域の蛍光細胞の母集団を収集した。1秒あたりの分析細胞数として定義されたデータ率は $(1.0 \pm 0.1) \times 10^3$ になるように調整した。このデータ率の設定では 10^7 個の細胞を数時間以内に検査することが可能であった。この実験では、 1×10^3 個の細胞がL領域での蛍光細胞として計数されたが、細胞の半数は回収されなかった。このため、蛍光細胞の実際の収集量は500~1000個の細胞となり、このようなFACSと組み合わせたEGFP再構築技術によって、MTS-結合融合ペプチドを高速で収集できることが示された。

【0039】

またセルソーティングの精度を評価するために、ここでは各単離クローンの蛍光強度と細胞内局在の分析を行った。cDNAがホストゲノム中に組み込まれているならば、BNL1MEmito細胞内では対応するタンパク質が構成され発現している筈であり、そのためEGFPの再構築はミトコンドリア内に留まる。これを確認するため200個の収集されたクローンの蛍光強度をFACSにより分析したが、このうち169個のクローンが様々な強度で蛍光を発していた（図9）。残り31個のクローンは蛍光を発せず、これらのcDNAはゲノムPCRにより回収されなかったことから、cDNAが核ゲノムに組み込まれなかったか、あるいは一度組み込まれたとしても細胞分裂途中に核ゲノムから脱落したことが示される。次に100個の蛍光細胞クローンをランダムに選択し、再構築されたEGFPの細胞内局在を調べた。EGFPはミトコンドリア内に限局していることが判明し（図9）、これらの細胞内ではミトコンドリアタンパク質をコードするcDNAがそれぞれのクローン内部に組み込まれており、cDNAシーケンスが即座に解析可能であることが示された。

2.3. 個別のcDNAクローンに対する分析

個々のcDNAの特徴を調べるため、それぞれのクローンから核ゲノムを抽出し、組み込まれたcDNAをPCR増幅により回収し、これをシーケンス分析に供した。分

析対象となった最初の150個のクローンのうち得られた発現シーケンスタグ (ESTs) には、1度だけ発現したタグが32個、複数回同定されたタグが28個含まれていた。冗長ではない合計60個のcDNAのうち、56個のクローンがGenBank中で同定された。残りの4個の遺伝子が新しく同定され、これにはミトコンドリアの標的シグナルが含まれていた。それぞれの新規遺伝子産物のミトコンドリア内における局在は、共焦点顕微鏡によって確認された。

【0040】

合計56個のGenBankに存在するクローンのうち、良く特徴の知られたミトコンドリアタンパク質が多数同定されたが、これらは例えばAcad1、Gcdh、Cox5b、ATPシンターゼ、Ucp2、マレイン酸デヒドロゲナーゼなどである (表1)。これらのタンパク質は全てミトコンドリア基質または内膜に存在している。特徴が不明な残りのクローンのうち、いくつかの遺伝子産物の機能については新しく次のように説明されている。例えば、No.10クローンに由来するcDNAは公開シーケンスデータベースのDDBJ (RIKEN全長cDNAクローン) において同定されている (Hayashizaki, Y. et al. Nature 2001, 409, 685-690)。No.10クローンとデータベースに由来するcDNAのリーディングフレームと予想される開始コдонはいずれも完全に一致している。公開データベースを用いた相同性分析によれば、クローニングされたcDNA断片と、Schizosaccharomyces pombeから誘導した推定チトクロームcオキシダーゼ組み立てタンパク質の間には、DNAレベルで23%の相同性が存在した。このためマウスクローンNo.10はチトクロームcオキシダーゼ組み立てタンパク質か、関連機能を持つタンパク質に属している。同様にクローンNo.92に由来するcDNAはヒトミトコンドリアの28Sリボソームタンパク質 (S18-1) のcDNAに対して76%の相同性があることが判明した。このような高い相同性と、この実験で得られたミトコンドリア局在化から、クローンNo.92のcDNAはマウスミトコンドリアのリボソームタンパク質であることが確認された。他のリボソームタンパク質であるS18 (クローンNo.51) は、マウスのリボソームタンパク質であることが既に同定されているが、局在化については詳しい考察がなされていない。MTSは20~60程度のアミノ酸残基により構成されており、一つの疎水性面と一つの陽性荷電面との間に両親媒性の α -らせんを形成する能力がある。アミノ末端およびミ

トコンドリア内のアミノ末端断片に塩基性および疎水性アミノ酸が存在しているという事実から、cDNAの転写産物はマウスのミトリボソームに特異的であることが示される。新規に注釈された他の遺伝子は、遺伝子名称と共に表1にまとめた。加えて表1に示した3個のクローンのcDNAは、リーディングフレームと開始コドンがRIKENの全長cDNAクローンに完全に一致することが分かっているが、他の真核細胞に対して著しい類似性はみられない。そのため、これらの3種類のクローンはミトコンドリア内に局在化する新規タンパク質であることが示される。

【0041】

【表 1】

センス cDNA のカテゴリー		クローン No.
マウスタンパク質と同一		
マレイン酸デヒドロゲナーゼ		11, 52, 53, 54
チトクローム c オキシダーゼ、サブユニット Vb (Cox5b)		20
ATP 合成酵素アルファサブユニット		23, 27, 84, 85, 95
脱共役タンパク質 2 (Ucp2)		35
グルタリル-CoA デヒドロゲナーゼ (Gcdh)		40, 43, 49, 57, 93
アセチル補酵素 A デヒドロゲナーゼ (Acad1)		58
チトクローム b		1
アルデヒドデヒドロゲナーゼ 2		140
ATP 合成酵素 H ⁺ 輸送、ミトコンドリア F1 複合体、 ガンマポリペプチド 1		143
ミトコンドリアリボソームタンパク質 S11		147
マウス遺伝子に類似		
ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ 2		71, 100
60S リボソームタンパク質 L3 (L4)		108
NADH-ユビキノンオキシドリダクターゼ 13kDa-A サブユニット		144, 150
無機ホスファターゼ		148
哺乳類遺伝子と相同		
推定チトクローム c オキシダーゼ組み立てタンパク質 (Schizosaccharomyces pombe, 23%)		10, 94
熱ショックタンパク質 75 (ヒト, 89%)		46, 70, 77
リボソームタンパク質 S18 (Rsp18) (ヒト, 76%)		51, 63
膜結合タンパク質 SLP-2 (ヒト, 93%)		87
ミトコンドリア 28S リボソームタンパク質 S18-1 (ヒト, 77%)		92
NADH-ユビキノンオキシドリダクターゼ 30kDa サブユニット前 駆物質 (ヒト, 88%)		99
コハク酸デヒドロゲナーゼ複合体、サブユニット B、鉄イオウ (ヒト, 91%)		135
ビフェニルヒドロラーゼ関連タンパク質 (ヒト, 75%)		145
予想されるタンパク質		
GI:12852607		16
GI:12840016		33, 37
GI:12859851		59, 72, 82

【0042】

3. 結論

以上の結果から、この発明の解析方法によって、ミトコンドリアに局在化する新規遺伝子産物を同定し、それによってこれらの機能を注釈するための迅速なア

プローチが提供可能であることが示される。また、ハイスループットスクリーニング技術によって、核、小胞体、ゴルジ体、ペルオキシソーム等の各オルガネラに局在化しているタンパク質グループの同定も、それぞれのシグナルを用いることによって容易に行うことができる。この発明の方法は単純であるため、cDNAライブラリーを構築する能力がありFACS設備を持つ当業者ならば、過度の試験を行うことなく、容易に実施することが可能である。さらに、この方法をcDNAサブトラクション法と組み合わせることによって、例えば正常状態と疾患状態、または異なる組織の発現遺伝子との比較を行うなどといった柔軟性がさらに付与される。

【0043】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、あらゆるオルガネラを対象として、簡便かつ正確にタンパク質局在を解析することのできる新しい方法と、この方法に使用する解析用材料を提供が提供される。

【0044】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Analysis method for organelle-localized protein and materials therefor

<130> NP02376

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligopeptide

<400> 1

Lys Phe Ala Glu Tyr Cys

1

5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligopeptide

<400> 2

Cys Phe Asn Lys Ser His

1

5

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 3

AGGACCTTAC ACAGTCCTGC TGACC

25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 4

GCCCTCGCCG GACACGCTGA ACTTG

25

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 5

CCGCCCTCAA AGTAGACGGC ATCGCAGC

28

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 6

CGCCGTCCAG CTCGACCAGG AT

22

【図面の簡単な説明】

【図 1】

この発明方法の基本的原理を示した模式図である。

【図 2】

実施例で作製した融合ペプチド(b)および(a)の構造と、タンパク質スプライシング後に再構築されるEGFPの構造を示した模式図である。塩基配列およびアミノ酸配列は、DnaEnとEGFPn、DnaEcとEGFPc、EGFPnとEGFPcの間のリンカーペプチド配列である。

【図 3】

実施例での解析プロセスの模式図である。

【図 4】

実施例で作製した組換えベクターの構造を示した模式図である。LTRは末端反復配列、 ψ はレトロウイルスパッケージングシグナル、IRESは内部リボソーム導入部位、NEOはネオマイシン耐性遺伝子を示す。

【図 5】

カルモジュリン (CaM) またはMTSを連結したEGFPn-DnaEnを発現しているBNL1MEmito細胞の全細胞溶解物のウェスタンブロッティング分析の結果である。EGFPcに特異的なモノクローナル抗体を用いて行った。

【図 6】

MTS-EGFPn-DnaEn融合ペプチドが発現し、ミトコンドリアに局在化していることを示す顕微鏡写真である。。MOI値5でpMX-Mito/LIB-MTSに感染させたBNL1MEmito細胞を2日間培養し、細胞をガラス底シャーレに蒔いた。生細胞の造影を行い (a; 透過型)、EGFPの蛍光の記録を共焦点顕微鏡により行った (b)。映像の撮影後、テトラメチルローダミンエチルエステルを用いて生細胞内のミトコンドリアを染色した (c)。(d) は、EGFPがミトコンドリアに特異的に局在していることを示すスーパーインポーズ画像である。

【図 7】

再構築されたEGFPを内包するBNL1MEmito細胞のFACSプロフィールである。左グラフは、BNL1MEmito細胞に対して、CaM-EGFPn-DnaEnを発現しているレトロウイルスをMOI値5で、MTS-EGFPn-DnaEnを発現しているものをMOI値5またはMOI値0.2で、それぞれ感染させた。コントロールとして未感染細胞を用いた。右グラフは、対照としてのレトロウイルス感染を測定した結果である。レトロウイルス感染の単回ヒット動態が、L領域のEGFP陽性細胞の比率に対するMOIの相関により示されている。全てのデータ点は10,000個の測定細胞から取得し、測定は3回繰り返した。挿入図は一次相関範囲の拡大グラフである。

【図 8】

FACSにより蛍光細胞を選別した結果である。(A) はBNL1ME細胞に感染効率20%でcDNAレトロウイルスライブラリーを感染させ、5日間のインキュベーション後

、細胞を剥離させ、FACSによりソートした結果である。未感染細胞を挿入し、バックグラウンド蛍光を示した。(B)は、(A)のL領域付近の拡大FACSプロフィールである。

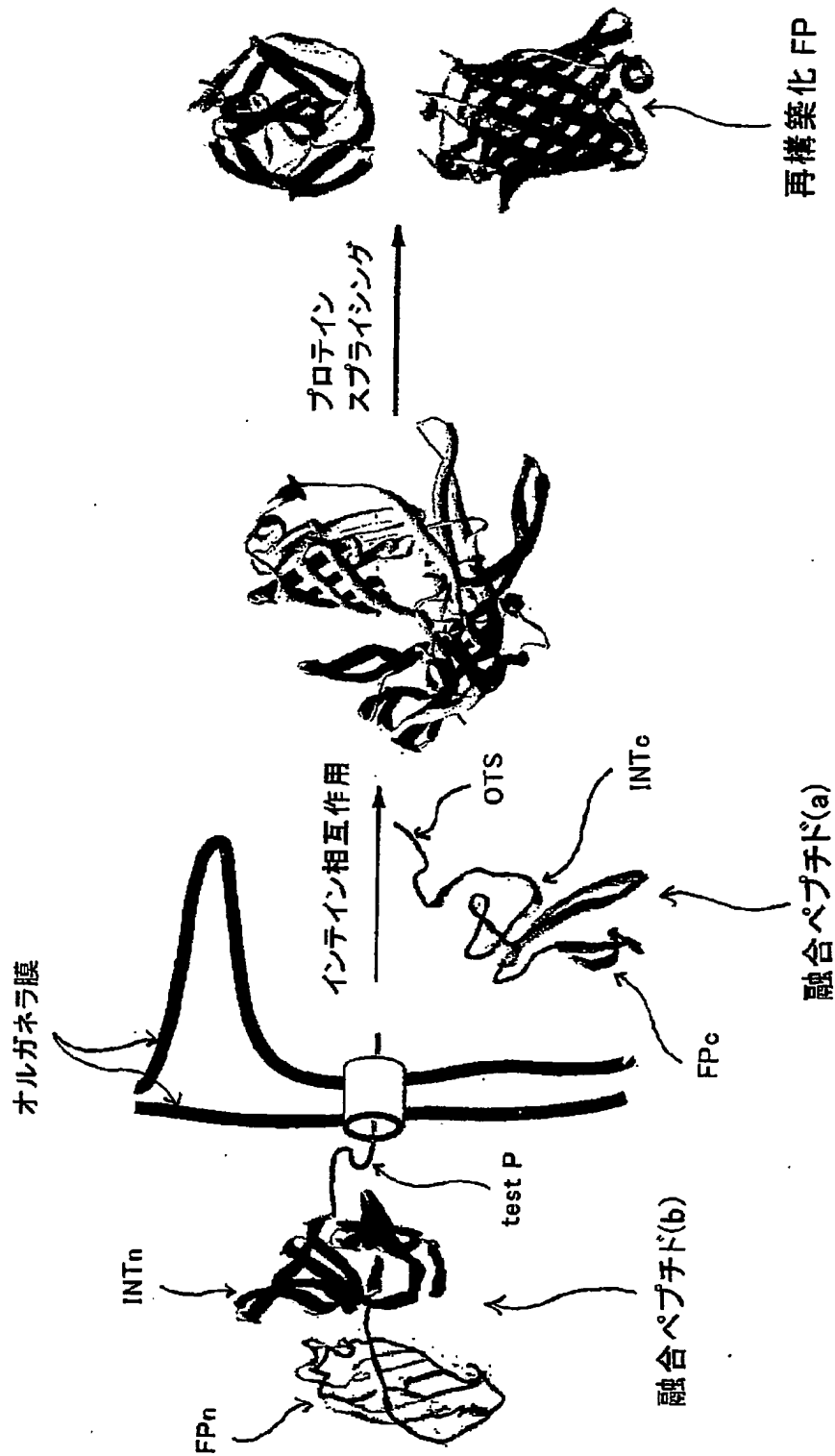
【図9】

代表的なクローン細胞のフローサイトメトリープロフィールと蛍光画像である。左グラフは、クローンされた細胞と未感染BNL1MEmito細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定した結果である。分析対象となる全細胞数は 10^5 個であった。右蛍光画像は、各クローン細胞をガラススライド上で培養し、再構築されたEGFPを内包する生細胞の共焦点画像を撮影した結果である。TMREを用いて細胞染色を行い、個々の細胞のミトコンドリアの局在を示した。積層共焦点画像により、EGFPの再構築がミトコンドリア内で生じていることが示された。

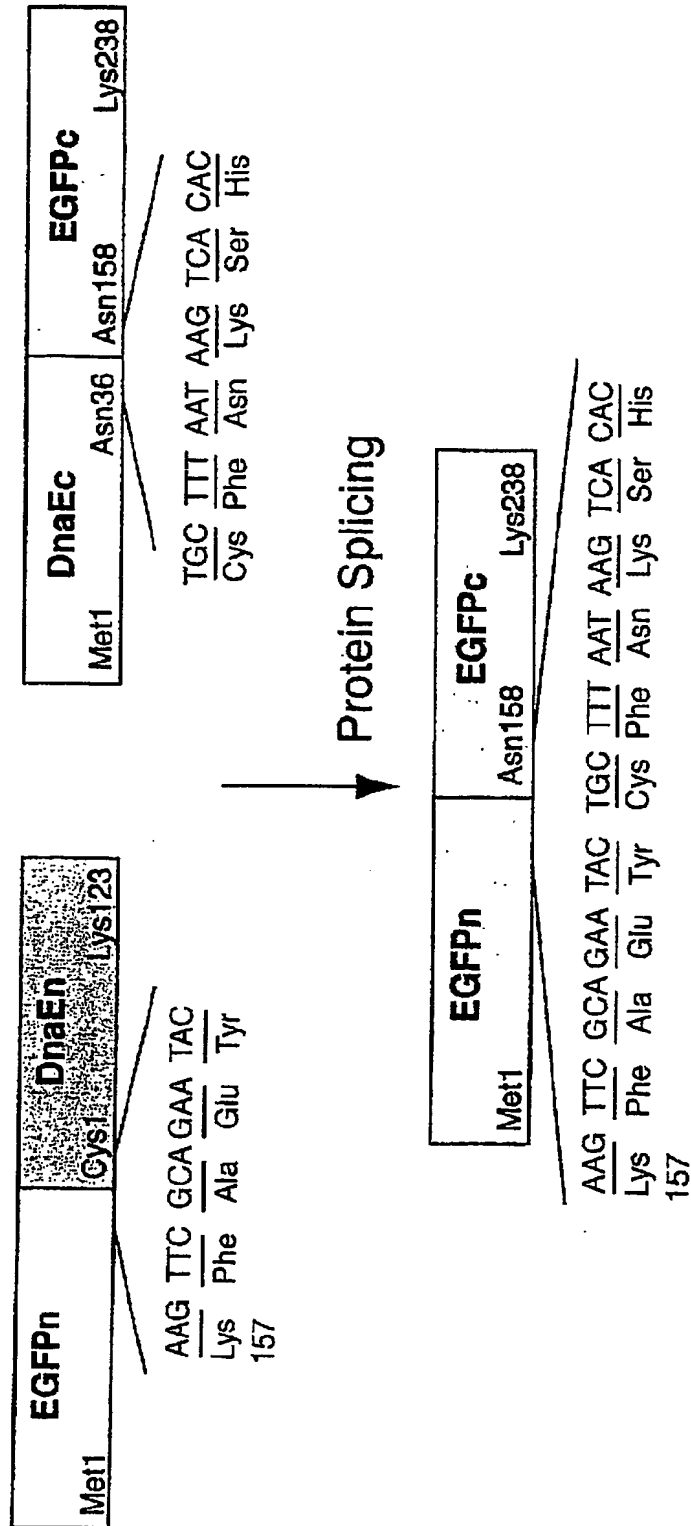
【書類名】

図面

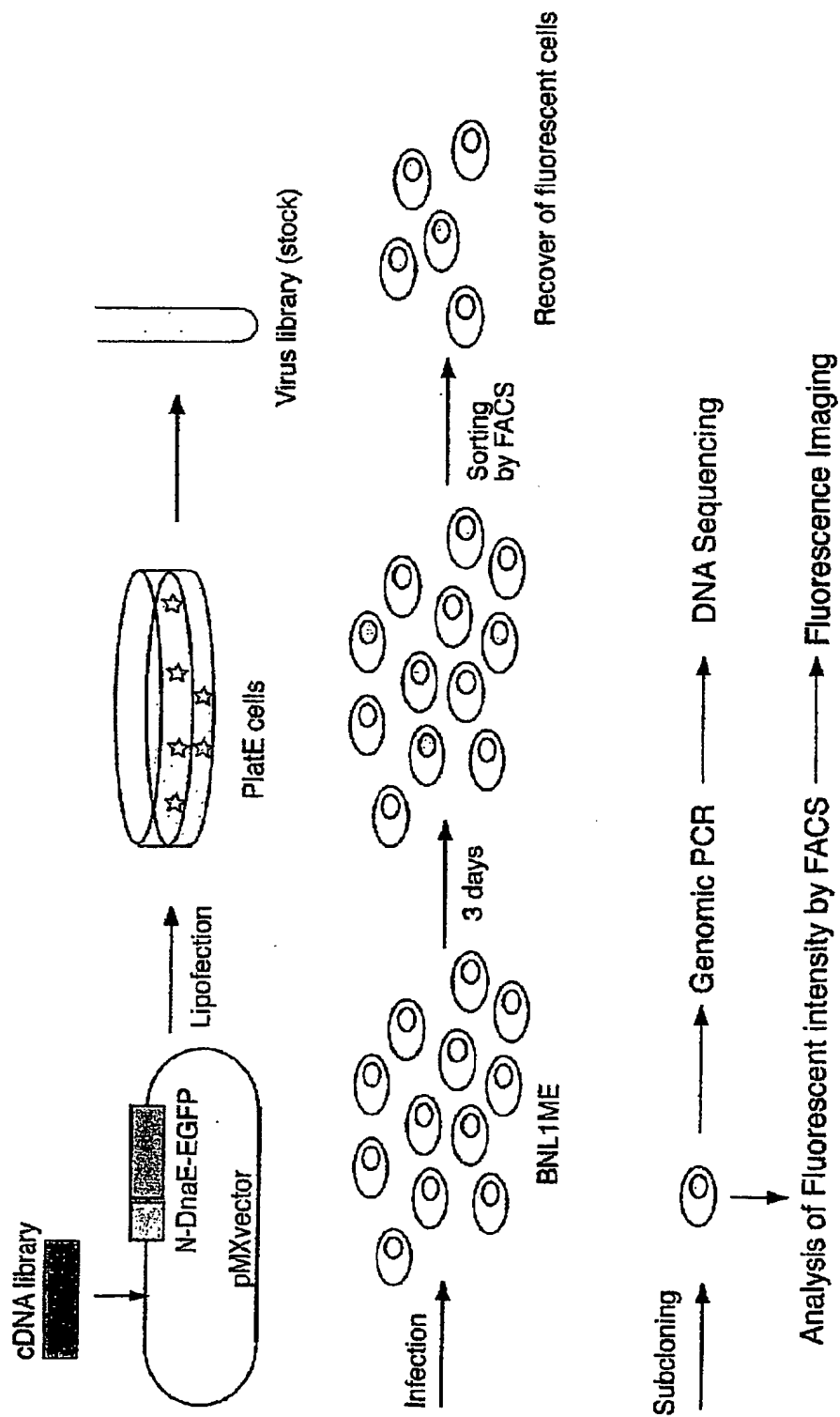
【図 1】



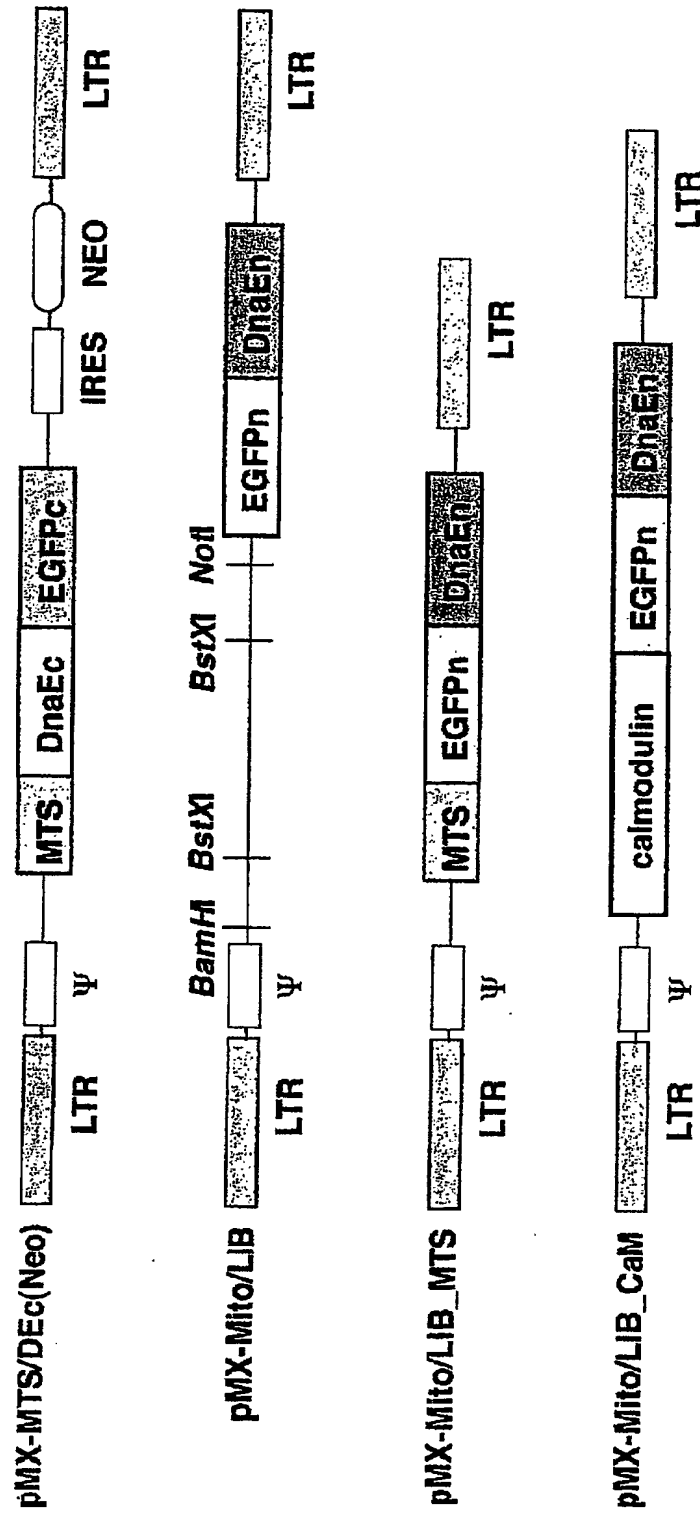
【図 2】



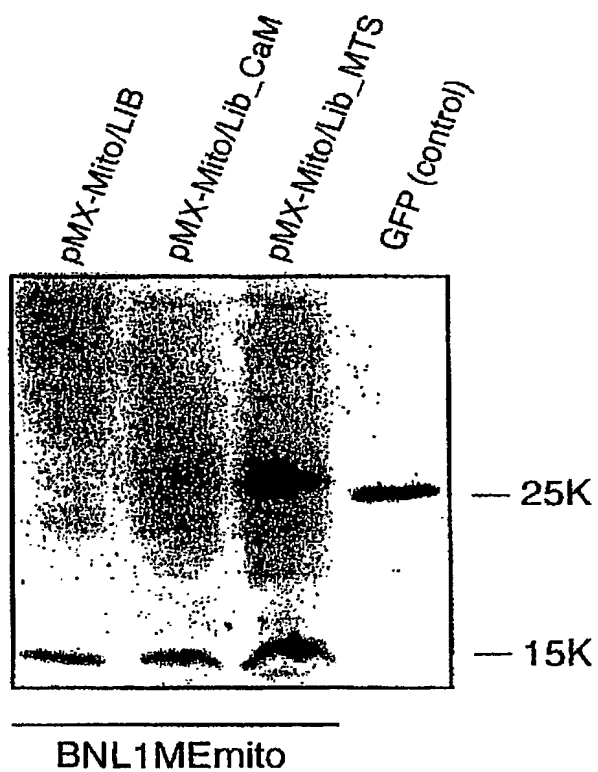
【図 3】



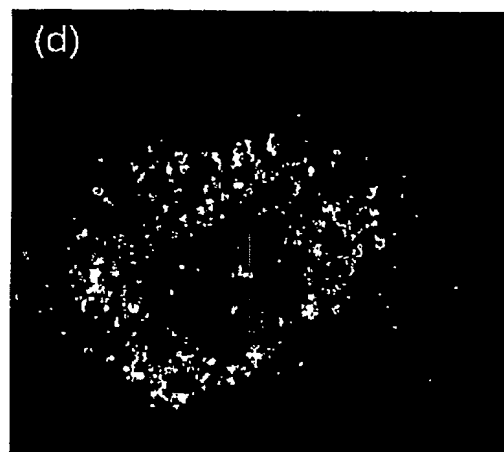
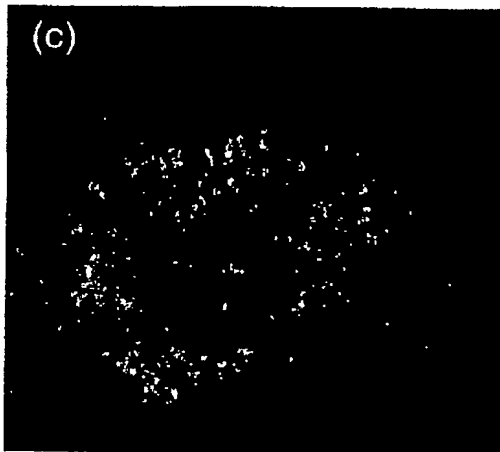
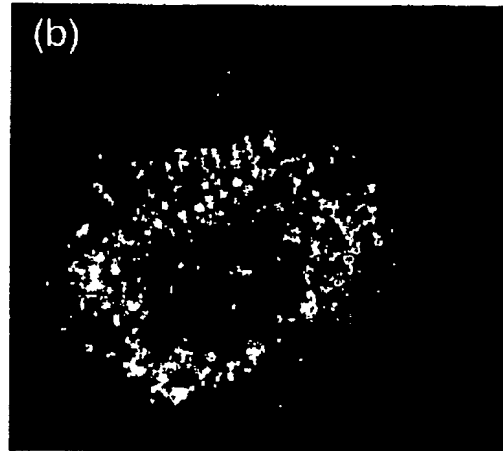
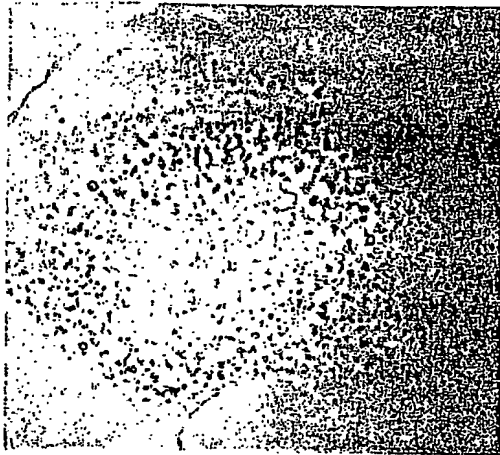
【図 4】



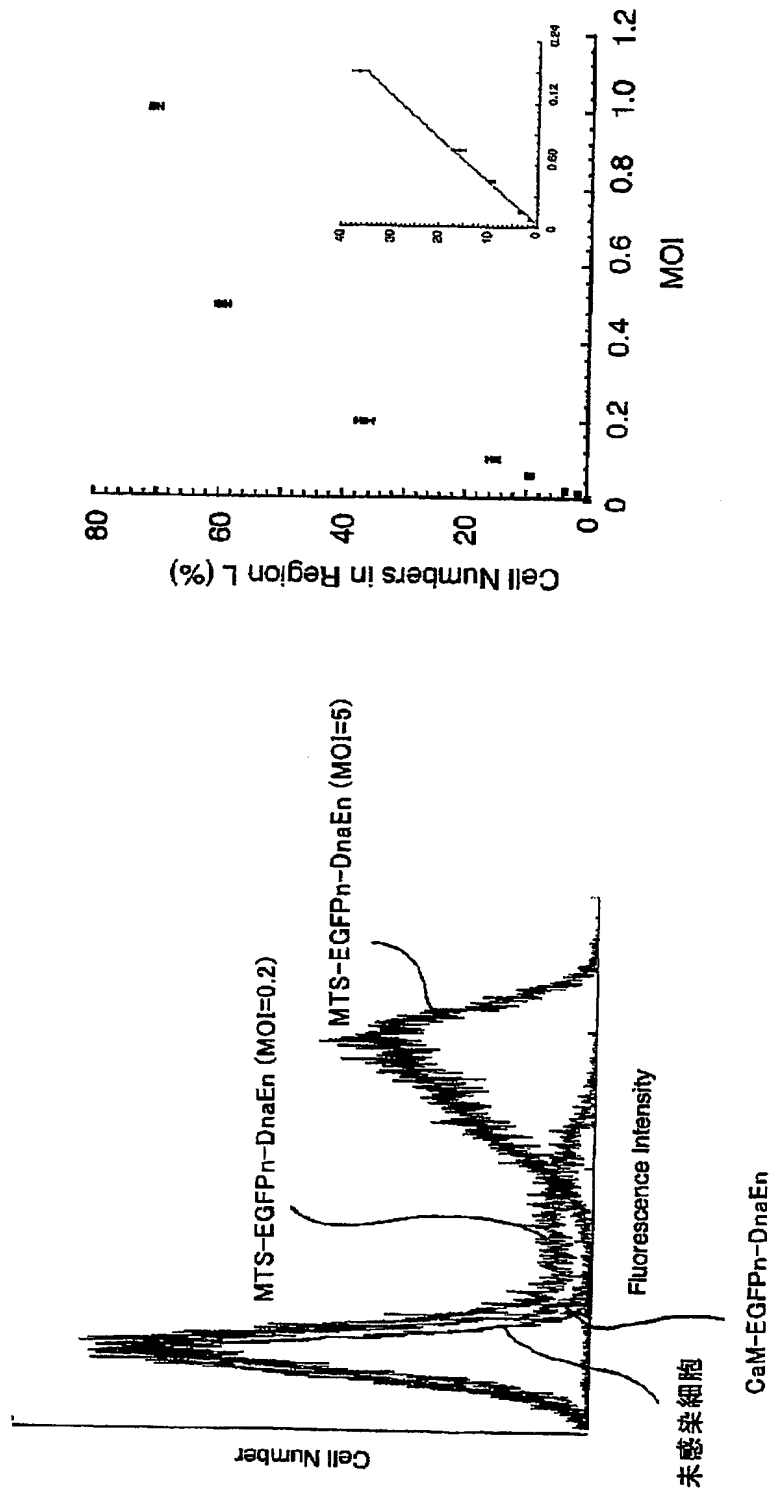
【図 5】



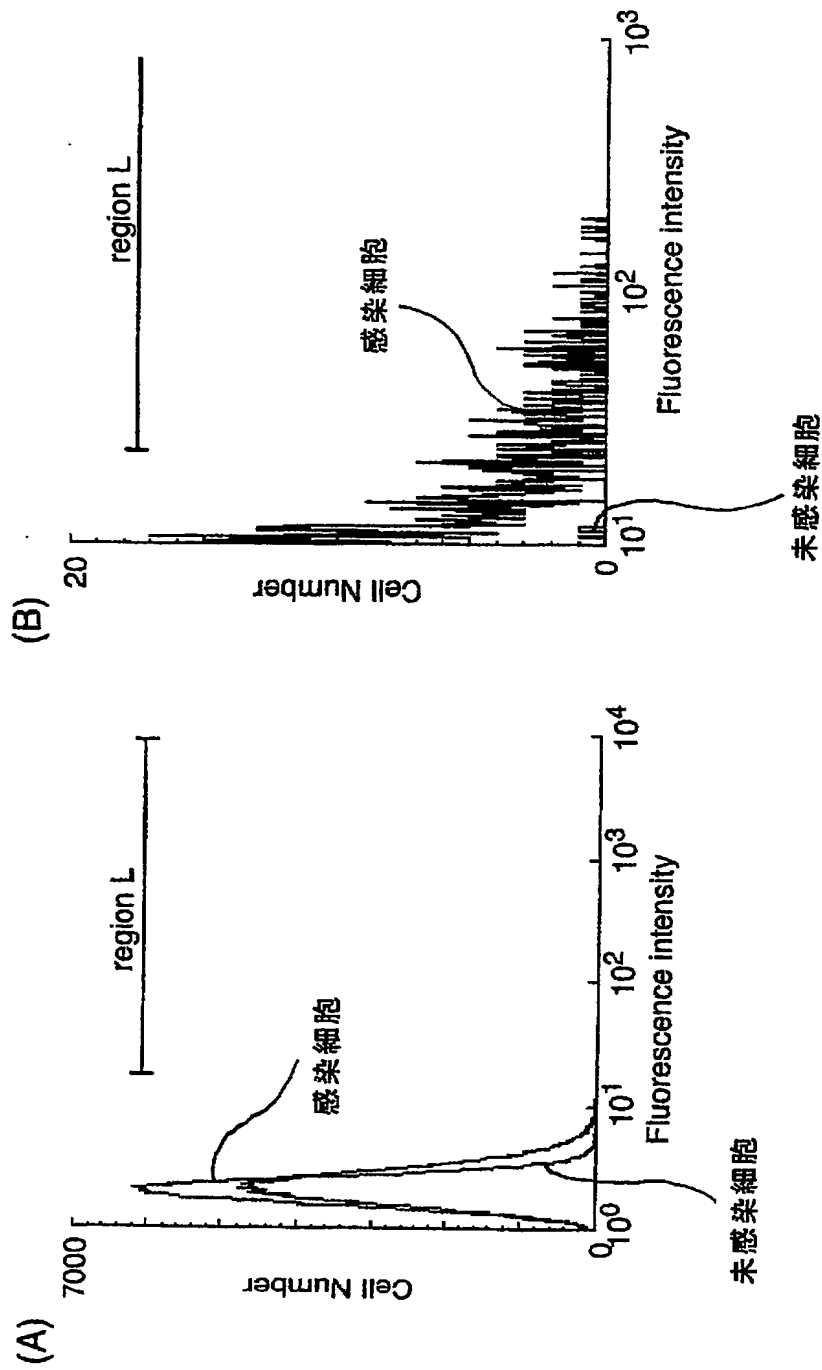
【図 6】



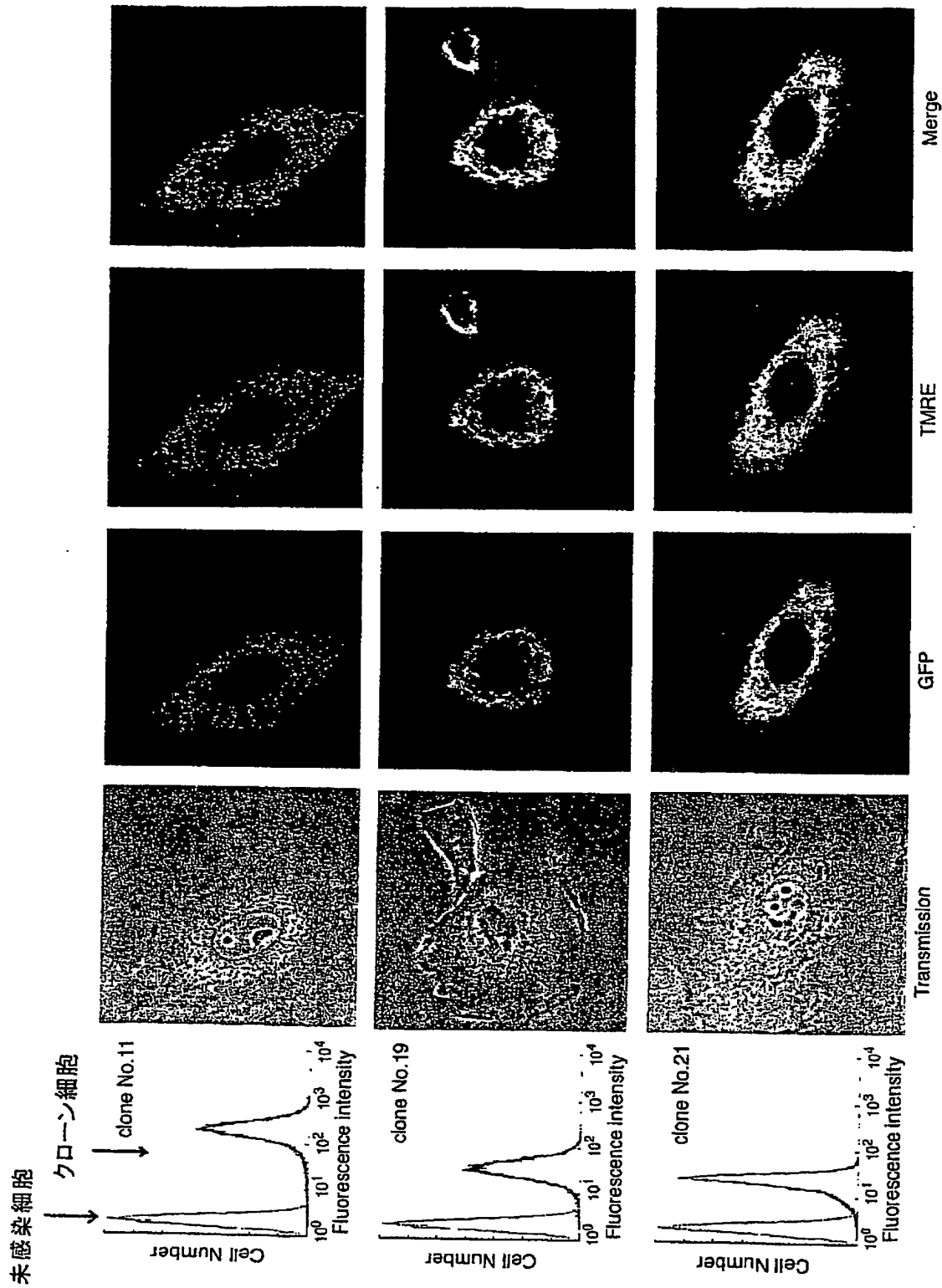
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 あらゆるオルガネラを対象として、簡便かつ正確にタンパク質局在を解析することのできる新しい方法と、この方法に使用する解析用材料を提供する。

【解決手段】 試験タンパク質がオルガネラに局在するか否かを解析する方法であって、(a)インテインの一方のハーフペプチド、蛍光タンパク質の一方のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド(a)を真核細胞内に導入するステップ；(b)前記蛍光タンパク質の他方のハーフペプチドおよび前記インテインの他方のハーフペプチドを含む融合ペプチド(b)に結合した試験タンパク質を真核細胞内に導入するステップ；および(c)前記蛍光タンパク質の発する蛍光信号を検出するステップ、を含むことを特徴とするオルガネラ局在タンパク質の解析方法と、この方法に使用する融合ペプチドおよび／またはその発現ベクター等の材料。

【選択図】 図1

特願 2002-272043

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.